

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

~~IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.~~

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



RECEIVED

AUG 15 2002

TECH CENTER 1600/2900

BREVET D'INVENTION

COPIE CERTIFIÉE CONFORME D'UNE DEMANDE INTERNATIONALE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande internationale déposée auprès de l'Institut en application du Traité de Coopération en matière de brevets (PCT) fait à Washington le 19 juin 1970.

Fait à Paris le 12 JUIN 2002

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30
<http://www.inpi.fr>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

REQUETE

COPIE POUR
L'OFFICE RECEPTEUR

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réserve à l'Office récepteur	
PCT/FR 98/01999	
Demande internationale n°	
(196911996)	
17 SEP. 1998	
Date du dépôt international	
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE	
Nom de l'Office récepteur et de la demande internationale PCT	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif) (12 caractères au maximum) b3693A-PB	

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION	
ACIDES NUCLEIQUES, CELLULES RECOMBINANTES, ET PROCEDE DE PREPARATION DE COMPOSITIONS IMMUNOGENES	
Cadre n° II DEPOSANT	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) INSTITUT PASTEUR 25-28 rue du Dr. Roux FR-75724 PARIS CEDEX 15 (France)	<input type="checkbox"/> Cette personne est aussi inventeur. n° de téléphone n° de télécopieur n° de téléimprimeur
Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE	Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés <input checked="" type="checkbox"/> tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique <input type="checkbox"/> les Etats-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire	
Cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) GIBERT Maryse 1 avenue Julia FR-92160 ANTONY (FR)	Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)
Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE	Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés <input type="checkbox"/> tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les Etats-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire	
<input checked="" type="checkbox"/> D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.	
Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRESENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE	
La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme: <input checked="" type="checkbox"/> mandataire <input type="checkbox"/> représentant commun	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.) ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A. 3, rue Chauveau-Lagarde F-75008 PARIS	n° de téléphone 01-44-51-18-00 n° de télécopieur 01-42-66-08-90 n° de téléimprimeur
<input type="checkbox"/> Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.	

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

POPOFF Michel-Robert
18 ter, rue Galliera
FR-92140 CLAMART (France)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :
FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :
FRANCE

Cette personne est
déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est
déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est
déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est
déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

Cadre n° V DESIGNATION D'ETATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées; une au moins doit l'être):

Brevet régional

- ☐ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre Etat qui est un Etat contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☐ EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre Etat qui est un Etat contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☐ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre Etat qui est un Etat membre de l'OAPI et un Etat contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée):

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanie | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie | <input type="checkbox"/> LT Lituanie |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie | <input type="checkbox"/> LV Lettonie |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbade | <input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarie | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brésil | <input type="checkbox"/> MN Mongolie |
| <input type="checkbox"/> BY Bélarus | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> MX Mexique |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NO Norvège |
| <input type="checkbox"/> CN Chine | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PL Pologne |
| <input type="checkbox"/> CZ République tchèque | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne | <input type="checkbox"/> RO Roumanie |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie |
| <input type="checkbox"/> EE Estonie | <input type="checkbox"/> SD Soudan |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne | <input type="checkbox"/> SE Suède |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande | <input type="checkbox"/> SG Singapour |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni | <input type="checkbox"/> SI Slovénie |
| <input type="checkbox"/> GE Géorgie | <input type="checkbox"/> SK Slovaquie |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GM Gambie | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan |
| <input type="checkbox"/> GW Guinée-Bissau | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan |
| <input type="checkbox"/> HR Croatie | <input type="checkbox"/> TR Turquie |
| <input type="checkbox"/> HU Hongrie | <input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago |
| <input type="checkbox"/> ID Indonésie | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> IL Israël | <input type="checkbox"/> UG Ouganda |
| <input type="checkbox"/> IS Islande | <input checked="" type="checkbox"/> US Etats-Unis d'Amérique |
| <input type="checkbox"/> JP Japon | |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KP République populaire-démocratique de Corée | <input type="checkbox"/> YU Yougoslavie |
| | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR République de Corée | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Libéria | |

Cases réservées pour la désignation (aux fins d'un brevet national) d'Etats qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille :

- ☐
- ☐

Déclaration concernant les désignations de précaution : outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

Cadre supplémentaire Si le cadre supplémentaire n'est pas utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

1. Si l'un des cadres du présent formulaire ne suffit pas à contenir tous les renseignements : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n°..." [préciser le numéro du cadre] et fournir les renseignements conformément aux instructions données dans le cadre dans lequel la place était insuffisante : en particulier :

- i) si plus de deux personnes sont en cause comme déposants ou inventeurs et que l'on ne dispose d'aucune "feuille annexe" : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° III" et fournir pour chaque personne supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre n° III. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous;
- ii) si, dans le cadre n° II ou dans l'un des sous-cadres du cadre n° III, la case "les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire" est cochée : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° II" ou "Suite du cadre n° III" ou "Suite des cadres n° II et III" (selon le cas), ainsi que le nom du ou des déposants en cause et, à côté de chaque nom, le ou les Etats pour lesquels la personne mentionnée a la qualité de déposant (ou, le cas échéant, la mention "brevet ARIPO", "brevet eurasién", "brevet européen" ou "brevet OAPI");
- iii) si, dans le cadre n° II ou dans l'un des sous-cadres du cadre n° III, l'inventeur ou l'inventeur/déposant n'a pas la qualité d'inventeur pour tous les Etats désignés ou pour les Etats-Unis d'Amérique : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° II" ou "Suite du cadre n° III" ou "Suite des cadres n° II et III" (selon le cas), ainsi que le nom du ou des inventeurs et, à côté de chaque nom, le ou les Etats pour lesquels la personne mentionnée a la qualité d'inventeur (ou, le cas échéant, la mention "brevet ARIPO", "brevet eurasién", "brevet européen" ou "brevet OAPI");
- iv) si, en plus du ou des mandataires indiqués dans le cadre n° IV, il y a d'autres mandataires : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° IV" et fournir pour chaque mandataire supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre n° IV;
- v) si, dans le cadre n° V, le nom d'un Etat (ou de l'OAPI) est assorti de la mention "brevet d'addition" ou "certificat d'addition" ou si, dans le cadre n° V le nom des Etats-Unis d'Amérique est assorti de la mention "continuation" ou "continuation-in-part" : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° V" ainsi que le nom de chaque Etat en cause (ou de l'OAPI) en précisant après chaque nom le numéro du titre principal ou de la demande principale ainsi que la date de délivrance du titre principal ou la date de dépôt de la demande principale;
- vi) si, dans le cadre n° VI, la priorité de plus de trois demandes antérieures est revendiquée : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° VI" et fournir pour chaque demande antérieure supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre n° VI;
- vii) si, dans le cadre n° VI, la demande antérieure est une demande ARIPO : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° VI", préciser le point correspondant à cette demande antérieure et indiquer au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée.

2. Si, en ce qui concerne la déclaration concernant les désignations de précaution contenue dans le cadre n° V, le déposant souhaite exclure un ou plusieurs Etats de la portée de cette déclaration : dans ce cas, indiquer "Désignations exclues de la portée de la déclaration concernant les désignations de précaution" et fournir le nom ou le code à deux lettres de chaque Etat concerné.

3. Si le déposant revendique, à l'égard d'un office désigné, le bénéfice de dispositions de la législation nationale concernant des divulgations non opposables ou des exceptions au défaut de nouveauté : dans ce cas, indiquer "Déclaration concernant des divulgations non opposables ou des exceptions au défaut de nouveauté" et rédiger au dessous cette déclaration.

Suite du cadre n° IV "autres mandataires" :

GUTMANN Ernest
PLASSERAUD Yves
DESAIX Anne
VAILLANT Jeanne
LAZARD Florence

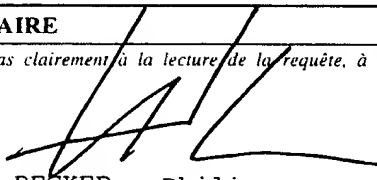
Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITE		<input type="checkbox"/> D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.		
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 19 sept - 1997 (19/09/1997)	9711710	FRANCE		
(2)				
(3)				

☒ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : 1

* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii)). Voir le cadre supplémentaire.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE			
Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie: le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA /	Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure: mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : Date (jour/mois/année) Numéro Pays (ou office régional) 19/09/1997 FA550512 FRANCE		

Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DEPOT	
La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant : requête : 5 description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 32 revendications : 3 abrégé : 1 dessins : 9 partie de la description réservée au listage des séquences : Nombre total de feuilles : 50	Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : 1. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes 2. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général: numéro de référence, le cas échéant : 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature 5. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : 6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) : 7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés 8. <input type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur 9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) : Copie du Rapport de Recherche
Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :	Langue de dépôt de la demande internationale : Français

Cadre n° IX SIGNATURE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE	
A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe. <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> Paris, le 16 septembre 1998 ERNEST GUTMANN- YVES PLASSERAUD S.A. </div> <div style="width: 45%; text-align: center;">  BECKER Philippe </div> </div>	

Réservé à l'office récepteur	
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale : 17 SEP. 1998 (17/09/1998)	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :	Réservé au Bureau international
--	---------------------------------

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 550512
FR 9711710

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	WO 95 17521 A (PASTEUR INSTITUT ;VETERINAIRES ET ALIMENTAI CENT (FR); FACH PATRIC) 29 juin 1995	1-3, 9-13,18, 19,21-23
Y	* exemple 7 *	4-18,20, 21
A	HUNTER S E C ET AL: "CLONING AND NUCLEOTIDE SEQUENCING OF THE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS EPSILON-TOXIN GENE AND ITS EXPRESSION IN ESCHERICHIA COLI" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 60, no. 1, janvier 1992, pages 102-110, XP000674523 * le document en entier *	1-3, 9-13,18, 19,21-23
Y	EP 0 453 216 A (CONNAUGHT LAB) 23 octobre 1991 * le document en entier *	4-18,20, 21
Y	BULLIFENT H L ET AL: "The construction of a reporter system and use for the investigation of Clostridium perfringens gene expression." FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 131, no. 1, - 15 août 1995 pages 99-105, XP002067231 * le document en entier *	4-18,20, 21
Y	WO 97 34001 A (SECR DEFENCE BRIT ;TITBALL RICHARD WILLIAM (GB); WILLIAMSON ETHEL) 18 septembre 1997 * le document en entier *	20
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
10 juin 1998		Van der Schaal, C
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO.**

 FA 550512
FR 9711710

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets,
ni de l'Administration française

10-06-1998

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9517521 A	29-06-1995	US 5538851 A EP 0739420 A	23-07-1996 30-10-1996
EP 0453216 A	23-10-1991	CA 2040548 A JP 5068556 A US 5643753 A	19-10-1991 23-03-1993 01-07-1997
WO 9734001 A	18-09-1997	AU 2103797 A	01-10-1997

ACIDES NUCLEIQUES, CELLULES RECOMBINANTES, ET PROCEDE DE
PREPARATION DE COMPOSITIONS IMMUNOGENES

5 La présente invention concerne de nouveaux acides nucléiques ayant une activité de promoteur transcriptionnel. Elle concerne également un procédé de préparation de polypeptides recombinants utilisant ces acides nucléiques, ainsi que les cellules recombinantes contenant ces acides nucléiques. L'invention concerne en outre un nouveau procédé de préparation
10 d'antigènes ou fragments d'antigènes, notamment de toxines bactériennes, plus préférentiellement de toxines de *Clostridium*, en vue de la préparation de compositions immunogènes et/ou vaccinales. Elle concerne encore des compositions immunogènes et/ou vaccinales ayant des propriétés améliorées.

15 La présente invention concerne plus particulièrement le domaine de la production de protéines toxiques bactériennes, notamment de toxines de *Clostridium* ou d'autres organismes pathogènes. Elle concerne en particulier la production améliorée de ces toxines, dans le but de réaliser des
20 préparations immunogènes ayant un pouvoir vaccinant accru.

Les pathologies d'origine bactérienne (choléra, dysenterie, entérites, etc) sont une cause de mortalité importante chez l'homme comme chez l'animal. Ces pathologies sont essentiellement d'origine alimentaire, liées à la présence
25 dans les éléments ingérés de bactéries pathogènes qui vont coloniser les parois mucosales, puis engendrer une toxicité et une nécrose des tissus. Les bactéries pathogènes appartiennent à des genres différents, parmi lesquels on peut citer notamment Actinomycetes, Bacillus, Bordetella, Clamidia, Clostridium, Corynebacterium, Escherichia, Fusobacterium, Listeria,
30 Mycobacterium, Mycoplasma, Samonella, Staphylococcus, Treponemo ou encore Vibro. Parmi ces bactéries pathogènes, les bactéries Clostridium représentent une classe importante, dont on peut mentionner par exemple les espèces suivantes : C. absonum, C. baratii, C. bifermentans, C. chauvei,

C. difficile, C. ghonii, C. lituseburense, C. novyi, C. perfringens, C. septicum, C. sordellii, C. subterminale et C. tetani.

5 Il a été montré que la pathogénicité de ces bactéries pathogènes est liée à la production, par celles-ci, de toxines ou entérotoxines. Aujourd'hui, la grande majorité de ces toxines a été identifiée et caractérisée.

10 Ainsi, la pathogénicité des souches de Clostridium septicum, connues comme étant responsables de la gangrène atraumatique, est liée à l'expression d'un facteur létal unique, désigné toxine alpha, dont le gène a été cloné (Ballard et al., Infection and Immunity 63 (1995) 340). La toxine produite par les souches de Clostridium sordellii a été désignée cytotoxine Cs Cyt. Les souches de C. perfringens sont généralement classées en 5 types (A-E) en fonction de la nature des toxines qu'elles produisent (toxines 15 alpha, bêta, epsilon, iota et entérotoxine). La toxicité de C. tetanii est liée à la production d'une toxine, de même que Bordetella produit la toxine pertussique ou C. tetani la toxine tétanique. D'autres toxines sont indiquées dans la suite du texte.

20 Les traitements disponibles actuellement sont essentiellement d'ordre prophylactique. Ainsi, des préparations vaccinales sont produites à partir de cultures de souches de bactéries pathogènes. Les surnageants contenant les toxines sont ensuite récoltés puis soumis à différentes étapes de concentration et/ou purification partielle. Les surnageants ou leurs 25 filtrats/concentrats sont ensuite soumis à une étape d'inactivation, afin de produire des toxines non-virulentes, mais conservant leur pouvoir immunogène (toxoides). Différentes techniques sont disponibles pour inactiver les toxines, et notamment des techniques chimiques ou génétiques, qui seront détaillées plus loin. Par ailleurs, le plus souvent, préalablement à 30 l'étape d'inactivation, les surnageants de cultures de différents organismes pathogènes sont regroupés afin d'obtenir des cocktails de toxines, dans le but de préparer des vaccins polyvalents.

Des exemples de tels vaccins disponibles dans le commerce sont par exemple le Miloxan^R, commercialisé par la société Rhône-Mérieux (Merial), France, permettant une protection des animaux contre les toxi-infections et les entérotoxémies dues à des souches de *Clostridium perfringens* et de
5 *Clostridium sordellii*. Plus particulièrement, cette préparation vaccinale contient des toxoïdes de *Clostridium perfringens* types B, C et D, de *Clostridium septicum*, de *Clostridium novyi* de *Clostridium tetani*, de *Clostridium chauvei* et de *Clostridium sordellii*. Un autre vaccin polyvalent est par exemple le Gletvax5^R, commercialisé par la société Mallinckrodt
10 Veterinary, France, permettant une protection contre la colibacillose des porcelets et les entérites à *Clostridium perfringens* de type C. Ce vaccin contient plus particulièrement des antigènes de *E. coli*, ainsi que des toxoïdes de la toxine bêta de *Clostridium perfringens* type C.

15 Les vaccins disponibles aujourd'hui présentent toutefois un certain nombres d'inconvénients. Ainsi, il s'agit essentiellement de mélanges de surnageants de cultures, dont la composition n'est pas définie exactement et dont la reproductibilité n'est donc pas entièrement assurée. En outre, s'agissant de vaccins polyvalents protégeant contre des organismes pathogènes différents,
20 leur production implique des fermentations séparées, d'organismes différents, et donc des conditions de culture et des normes de sécurité très contraignantes sur le plan industriel. En outre, certains de ces vaccins ont une efficacité limitée à l'égard de certaines toxines, notamment de celles produites en quantités faibles par les organismes pathogènes.

25 Il existe donc un réel besoin de pouvoir améliorer les conditions de préparation, la qualité et l'efficacité des vaccins contre les toxines bactériennes. La présente invention apporte une solution avantageuse à ces problèmes.

30 La présente invention fournit en effet de nouveaux acides nucléiques permettant l'expression de transgènes dans des bactéries, notamment de type *Clostridium*. L'invention fournit également des constructions permettant

la production dans des bactéries, notamment de type *Clostridium*, de quantités plus importantes de toxines, dans un but vaccinal notamment. La présente invention fournit en particulier des souches de bactéries recombinantes, notamment de type *Clostridium*, permettant la production
5 amplifiée de toxines, qu'il s'agisse de toxines de *Clostridium* ou de toxines d'autres organismes pathogènes. L'invention fournit également des souches de bactéries recombinantes, notamment de type *Clostridium*, permettant la production de plusieurs toxines simultanément.

L'invention décrit ainsi une méthode de production de toxines recombinantes
10 permettant d'augmenter le caractère immunogène des préparations vaccinales, et ainsi leur effet protecteur.

L'invention décrit aussi la production par voie recombinante de nouvelles toxines, permettant d'élargir la gamme des vaccins existants, notamment vis-à-vis de la toxine bêta2 de *Clostridium perfringens* ou d'autres toxines
15 faiblement produites par les organismes pathogènes, ou faiblement immunogènes.

L'invention permet également une mise en oeuvre industrielle considérablement plus aisée, dans la mesure où les volumes de surnageants produits et où la diversité des organismes producteurs utilisés peuvent être
20 réduits significativement.

Un premier aspect de l'invention concerne plus particulièrement des acides nucléiques et des constructions génétiques permettant une production améliorée de protéines chez les bactéries, notamment de toxines
25 bactériennes dans les bactéries du genre *Clostridium*, particulièrement *Clostridium perfringens*.

Ainsi, le demandeur a isolé à partir du génome d'une souche de *Clostridium perfringens* de type C le gène complet codant pour une toxine, désignée toxine bêta2 (SEQ ID n° 1). L'étude du gène obtenu a montré que ce gène
30 comporte en outre, en 5', une région promotrice de la transcription (SEQ ID n° 2), efficace dans les bactéries notamment dans les bactéries du genre *Clostridium*, particulièrement *Clostridium perfringens*.

Un premier objet de l'invention réside donc plus particulièrement dans un acide nucléique caractérisé en ce qu'il présente une activité de promoteur transcriptionnel et en ce qu'il comprend :

(a) tout ou une partie de la séquence SEQ ID n° 2 ou d'un variant de celle-ci, ou

(b) une séquence hybridant avec tout ou partie du brin complémentaire de la séquence SEQ ID n° 2.

Plus préférentiellement, l'acide nucléique selon l'invention comprend tout ou une partie de la séquence SEQ ID n° 2.

Avantageusement, l'acide nucléique de l'invention est constitué du promoteur du gène de la toxine bêta 2 de *Clostridium perfringens* ou d'un fragment de celui-ci.

Le terme "acide nucléique" désigne au sens de l'invention tout acide désoxyribonucléique (ADN) ou ribonucléique (ARN). Un ADN peut être plus particulièrement un ADN complémentaire (ADNc), un ADN génomique (ADNg) ou un ADN synthétique. Au sens de la présente invention, le terme "acide nucléique" est également synonyme de "polynucléotide". Les acides nucléiques de l'invention peuvent être d'origine diverses, et notamment d'origine bactérienne, synthétique ou semi-synthétique. Ils peuvent être isolés par toutes les techniques connues de la Biologie moléculaire, en utilisant les données structurales et de séquences fournies par la présente demande. Ainsi, ces acides nucléiques peuvent être isolés à partir de banques, par des techniques d'hybridation. Ils peuvent aussi être synthétisés chimiquement ou génétiquement.

Le terme "partie" ou "fragment" de l'acide nucléique désigne tout acide nucléique comportant au moins une partie de la séquence concernée (par exemple la séquence SEQ ID n° 2) et conservant une activité de promoteur transcriptionnel. La partie de la séquence comprend avantageusement 50 pb au moins, plus préférentiellement au moins 100 pb. Ces "parties" peuvent

être générées aisément par les techniques classiques de la biologie moléculaire, soit par clivage et digestion enzymatiques à partir des fragments décrits, soit par synthèse en utilisant des synthétiseurs d'acides nucléiques.

- 5 Le terme "hybridant" désigne au sens de l'invention toute hybridation dans des conditions normales, stringentes ou non, telles que définies ci-après. Des conditions d'hybridation stringentes sont par exemple : Hybridation à 42°C, 50% formamide, 5 X SSC, 1 X Denhardt ; Lavage à 65°C en 0,1 X SSC, 0,1% SDS. Des conditions non-stringentes sont notamment :
- 10 Hybridation à 37°C, 40% formamide, 5 X SSC, 1 X Denhardt ; Lavage à 50°C en 1 X SSC, 0,1% SDS. Les conditions stringentes sont particulièrement adaptées lorsque les acides nucléiques sont présents en faibles quantités et/ou sous forme peu purifiée. Les conditions non stringentes sont plus adaptées lorsque l'acide nucléique est présent en quantités plus importantes
- 15 et se trouve sous forme significativement représentée dans l'échantillon. Avantagusement, les séquences "hybridant" sont des séquences qui hybrident en conditions stringentes, et qui possèdent donc un degré d'homologie structurale élevé avec la séquence concernée (par exemple la séquence SEQ ID n° 2) ou ses fragments. En outre, les séquences hybridant
- 20 peuvent comporter une région permettant l'hybridation et une région contigüe n'hybridant pas, mais correspondant aux régions flanquantes.

- Par ailleurs, l'activité de promoteur transcriptionnel des "fragments" ou "parties" et "séquences hybridant" peut être contrôlée aisément par l'homme
- 25 du métier selon la méthodologie décrite dans les exemples. En particulier, l'activité des fragments/hybridants peut être vérifiée en introduisant ces acides nucléiques en 5' d'un gène marqueur, puis en étudiant l'expression de ce marqueur dans une population de cellules telles que par exemple des bactéries du genre *Clostridium*, notamment *Clostridium perfringens*.

30

Les exemples présentés plus loin montrent que les acides nucléiques de l'invention permettent d'amplifier de manière significative l'expression d'une protéine dans une bactérie, notamment dans un *Clostridium perfringens*.

Ainsi, sur une souche sauvage productrice de toxine beta2, le niveau de production est augmenté d'un facteur 40 à 80 environ en présence d'un acide nucléique de l'invention. Par ailleurs, les exemples qui suivent montrent en outre que ces acides nucléiques permettent l'expression à des taux significatifs de protéines hétérologues dans les bactéries du genre Clostridium. En particulier, les exemples montrent que les acides nucléiques de l'invention permettent la production de toxines hétérologues dans ces bactéries.

10 A cet égard, l'invention concerne également une cassette d'expression d'un transgène caractérisée en ce qu'elle comprend, dans l'orientation 5' -> 3' :

- un acide nucléique tel que défini ci-avant, et
- ledit transgène.

15 Dans la cassette de l'invention, l'acide nucléique et le transgène sont liés ensemble de manière opérationnelle (c'est à dire de sorte que l'acide nucléique permet l'expression dudit transgène).

Avantageusement, la cassette selon l'invention comprend en outre, en 3' du transgène, un terminateur transcriptionnel.

Par ailleurs, la cassette de l'invention peut également comporter de manière avantageuse un signal de sécrétion, permettant d'induire ou d'augmenter la sécrétion du produit d'expression du transgène par les cellules. Avantageusement, ce signal de sécrétion est localisé entre l'acide nucléique de l'invention et le transgène, en phase de lecture avec ce dernier.

A cet effet, les inventeurs ont également mis en évidence, dans le gène identifié, l'existence d'un tel signal de sécrétion, particulièrement actif dans les bactéries du genre Clostridium. Ce signal est représenté par les résidus 268-357 sur la séquence SEQ ID n° 1, et séparément sur la séquence SEQ ID n°3. Ce signal, ou tout variant ou fragment actif de celui-ci, constitue un mode de réalisation avantageux de l'invention.

Comme indiqué précédemment, l'invention est particulièrement appropriée pour la production de toxines ou fragments ou variants de toxines. Ainsi, dans un mode de mise en oeuvre particulier, la cassette d'expression selon l'invention est caractérisée en ce que le transgène code pour une toxine ou un fragment ou variant de toxine. Plus particulièrement encore, le transgène code pour une toxine ou un fragment ou variant de toxine d'une bactérie pathogène.

On entend par "toxine" au sens de l'invention tout peptide, polypeptide ou protéine produit par une bactérie pathogène, et impliqué dans ladite activité pathogène. Il peut s'agir d'un facteur directement responsable de la toxicité de la bactérie, ou participant à cette toxicité. Un "fragment" de toxine peut être constitué de toute partie d'une toxine, ayant conservé certains motifs immunogéniques de la toxine. En particulier, il a été décrit que les toxines bactériennes présentent souvent différents domaines fonctionnels distincts, et notamment un domaine impliqué dans l'activité toxique (site catalytique) distinct d'autres domaines impliqués dans la reconnaissance de sites ou dans des interactions avec des partenaires. Un "fragment" de toxine selon l'invention est constitué avantageusement d'un domaine dépourvu d'activité toxique, mais conservant un pouvoir immunogène. Un variant de toxine peut être constitué par exemple d'un dérivé résultant de modifications génétiques de la séquence codant pour ladite toxine ou fragment de toxine. De telles modifications génétiques sont par exemple des mutations, délétions, fusions, etc. Généralement, les mutations affectent de 1 à 10 résidus, de préférence de 1 à 5 résidus. Ces mutations sont des mutations modifiant l'acide aminé codé, et donc la séquence de la protéine. Les délétions peuvent être des délétions internes ou terminales. Elles peuvent affecter jusqu'à 40% de la séquence entière. Les fusions consistent à introduire des régions supplémentaires en 5' et/ou en 3' de la séquence, ou éventuellement à insérer de telles régions au sein de la séquence. Ces modifications peuvent être effectuées dans le but soit de diminuer, voire supprimer la toxicité de ces protéines, soit d'améliorer leur production ou leur stabilité par exemple. De telles modifications génétiques peuvent être réalisées selon les

conditions classiques de la biologie moléculaire, et sont illustrées dans l'art antérieur ainsi que dans la suite du texte de la présente demande.

Plus particulièrement, les cassettes de l'invention sont adaptées à la
5 production des toxines ou variant suivants :

. Toxine Beta 2 de *Clostridium perfringens* ou tout fragment immunogène. Le profil d'hydrophilicité de la toxine Beta2 est représenté sur la figure 8. Ce profil fait apparaître plusieurs régions hydrophiles, qui définissent des fragments particuliers au sens de l'invention. Ces régions sont notamment
10 localisées au niveau des résidus d'acides aminés 40-55, 105-120, 160-170, 175-188, 200-210 et 250-260 tels que représentés sur la séquence SEQ ID n° 1. Par ailleurs, des fragments de la toxine Béta2 dépourvus de toxicité sont notamment les fragments tryptiques de 24, 15 et 13 kDa décrits dans les exemples. Des constructions pour l'expression de cette toxine sont
15 décrites dans les exemples.

. Toxine Béta1 de *Clostridium perfringens* ou tout fragment immunogène. La séquence de cette toxine a été décrite dans la littérature (Hunter et al., Infect. Immun. 61 (1993) 3958-3965). Des constructions pour l'expression de cette toxine sont décrites dans les exemples.

20 . Toxines Iota de *Clostridium perfringens* ou tout fragment immunogène. La séquence des gènes codant pour les toxines Iota1 (gène Ia) et Iota2 (gène Ib) ont été décrites dans la littérature (Perelle et al., Infect. Immun. 61 (1993) 5147-5156).

. Toxine alpha de *C. novyi* ou tout fragment immunogène. La séquence du
25 gène de cette toxine (gène tcn α) a été décrite dans la littérature (Hofmann et al., Mol. Gen. Genet. 247 (1995) 670-679).

. Toxine alpha de *C. septicum* ou tout fragment immunogène. La séquence du gène de cette toxine a été décrite dans la littérature (Ballard et al., Infect. Immun. 63 (1995) 340-344).

30 . Toxines A et B de *C. difficile* ou tout fragment immunogène. La séquence du gène de ces toxines a été décrite dans la littérature, ainsi que différentes régions immunogènes (Von Eichel-Streiber et al., Mol. Gen. Genet. 233

- (1992) 260-268 ; Von Eichel-Streiber et al., J. Gen. Microbio. 135 (1989) 55-64 ; Von Eichel-Streiber et al., J. Bacteriol. 174 (1992) 6707-6710).
- . Toxine epsilon de *C. perfringens* (Worthington et al., Onderstepoort J. Vet. Res. 40 (4) (1973) 145-152; Hunter et al. Infect. Immun. 60, (1992) 102-110).
- 5 . Enterotoxine de *C. perfringens* (McClane, Toxicon. 34 (1996) 1335-1343).
- . Toxine de *C. chauvoei* (Crichton et al., Australian Vet. J. 63 (1986) 68).
- . Cytotoxine L de *C. sordellii* ou tout fragment immunogène. La séquence du gène de cette toxine a été décrite dans la littérature (Green et al., Gene 161 (1995) 57-61), ainsi que différentes régions immunogènes. En particulier,
- 10 cette toxine est constituée d'une protéine de 270 kDa environ et différents fragments antigéniques ont été décrits.
- . Toxine pertussis.
- . Toxine tétanique, toxique botulique, en particulier le fragment C de ces toxines qui est le fragment immunogène (Makoff et al., Bio/Technology 7,
- 15 (1989) 1043; Figueiredo et al., Infect. Immun. 63 (1995) 3218-3221; Wells et al., Molecular Microbiol. 8 (1993) 1155-1162; Boucher et al, Infect. Immun.; 62 (1994) 449-456, Clare et al., Bio/Technology 9 (1991) 455; Clayton et al., Infect. Immun. 63 (1995) 2738-2742).
- 20 Les acides nucléiques et/ou les cassettes d'expression selon l'invention peuvent être insérés dans un vecteur, qui constitue un autre objet de la présente invention. Avantageusement, il s'agit d'un vecteur fonctionnel dans les bactéries, c'est-à-dire capable de pénétrer dans les bactéries et d'y transporter les acides nucléiques de l'invention. Plus préférentiellement, un
- 25 tel vecteur comporte soit une origine de réplication fonctionnelle dans une bactérie, soit des séquences lui permettant de s'intégrer dans le génome d'une bactérie. Il peut s'agir plus particulièrement d'un plasmide, phage, épisode, etc. En outre, certains vecteurs peuvent comporter avantageusement deux origines de réplication, l'une fonctionnelle dans des
- 30 bactéries du genre *E. coli*, l'autre fonctionnelle dans des bactéries du type *Clostridium* par exemple.

De manière particulièrement préférée, le vecteur de l'invention est un vecteur fonctionnel dans les bactéries du genre *Clostridium*, notamment dans les bactéries *Clostridium perfringens*. Il peut s'agir à titre d'exemple d'un vecteur dérivé du plasmide pAT19 décrit par Trieu-Cuot et al. (Gene 102 (1991) 99-104). Un tel dérivé est par exemple le vecteur pMRP353 ou le vecteur pMRP268 tels que représentés sur les figures 2-4.

L'invention concerne en outre toute cellule recombinante comprenant un acide nucléique ou une cassette d'expression ou un vecteur tels que définis ci-avant. Avantageusement, la cellule recombinante est une cellule procaryote, de préférence une bactérie. De manière particulièrement avantageuse, la cellule de l'invention est une bactérie du genre *Clostridium* choisie parmi *C. absonum*, *C. baratii*, *C. bifermentans*, *C. chauvei*, *C. difficile*, *C. ghonii*, *C. lituseburense*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. subterminale* et *C. tetani*. Encore plus préférentiellement, il s'agit d'une bactérie *C. perfringens*.

Les cellules recombinantes de l'invention peuvent être préparées en utilisant toutes les techniques connues de l'homme du métier permettant l'introduction d'un acide nucléique dans une cellule. Il peut s'agir par exemple de techniques physiques (électroporation, bombardement, "gene gun", etc.) de techniques chimiques (précipitation au CaPO_3 , utilisation d'agents de transfert chimiques : lipides cationiques, polymères, etc) ou d'autres méthodes telles que la fusion de cellules, la conjugaison, etc. (Scott et al., Gene 82 (1989) 327-333; Phillips-Jones, FEMS Microbiol. Letters 66 (1990) 221-226; Allen et al., FEMS, Microbiol. Letters 70 (1990) 217-220).

En outre, une cellule recombinante de l'invention peut comporter plusieurs cassettes ou vecteurs de l'invention comprenant des transgènes différents, et produire ainsi soit des toxines différentes, soit des fragments différents d'une même toxine.

L'invention concerne également un procédé de production d'un polypeptide comprenant l'introduction dans une cellule hôte d'un transgène codant pour ledit polypeptide sous contrôle d'un promoteur tel que défini dans l'invention, puis la récupération dudit polypeptide.

5

Un procédé particulier de production de polypeptides selon l'invention comprend la culture d'une cellule recombinante telle que définie ci-dessus comprenant une cassette d'expression ou un vecteur, le transgène codant pour ledit polypeptide.

10

Plus particulièrement, dans le procédé de l'invention, la cellule est une bactérie du genre *Clostridium*, encore plus préférentiellement *C. perfringens*.

Le procédé de l'invention est tout particulièrement adapté à la production d'une toxine ou d'un toxoïde. Le terme "toxinoïde" est bien connu de l'homme du métier, et désigne toute forme inactivée d'une toxine, c'est-à-dire dépourvue de caractère toxique, mais conservant des propriétés immunologiques de la toxine. A titre particulièrement préféré, le procédé de l'invention est utilisé pour la production d'une toxine (ou d'un toxinoïde correspondant) choisie parmi le groupe comprenant les toxines alpha, bêta (bêta1 et bêta2), iota (1 et 2), epsilon et entérotoxine de *C. perfringens*, la toxine pertussique, la toxine tétanique, la toxine alpha de *C. septicum*, la toxine alpha de *C. novyi*, les toxines A et B de *C. difficile* ou la cytotoxine L de *C. sordellii*.

25

De manière plus générale, l'invention concerne donc l'utilisation d'un acide nucléique tel que défini ci-avant pour la production de polypeptides.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une composition immunogène comprenant les étapes suivantes :

30

a) l'expression d'une ou plusieurs toxines (ou toxinoïdes correspondants) dans une cellule telle que définie ci-avant,

b) la récolte du surnageant,

c) de manière facultative, le traitement du surnageant pour purifier ou concentrer la (les) toxine(s) ou toxoïde(s),

d) l'inactivation de la (des) toxine(s), et

e) de manière facultative, le conditionnement de la (des) toxine(s)
5 inactivée(s) ou du (des) toxoïde(s).

Dans le procédé de l'invention, une étape supplémentaire facultative, située avant ou après l'étape d), comprend le regroupement du surnageant avec d'autre(s) surnageant(s) de culture contenant une toxine différente ou
10 identique, ou un toxoïde correspondant. Ce ou ces autres surnageants peuvent provenir de souches recombinantes telles que définies dans l'invention, ou de toute autre souche, recombinante ou non, productrice de la toxine considérée. Avantageusement, dans le procédé de l'invention deux surnageants sont regroupés, provenant de cultures de bactéries
15 recombinantes selon l'invention produisant une toxine différente.

a) Production des surnageants

La première étape dans la production des compositions immunogènes de l'invention consiste à produire des surnageants de culture contenant la ou
20 les toxines considérées. Avantageusement, les surnageants proviennent au moins en partie d'une souche bactérienne recombinante comprenant une cassette ou un vecteur tel que défini ci-avant. Dans le cas de vaccins polyvalents, plusieurs voire tous les surnageants peuvent être des
25 surnageants de souches bactériennes recombinantes comprenant une cassette ou un vecteur tel que défini ci-avant. Plus préférentiellement, il s'agit de souches recombinantes de Clostridium, plus préférentiellement C. perfringens. Un des avantages du procédé de l'invention est qu'il permet de limiter le nombre d'organismes différents employés pour les fermentations.
30 Par ailleurs, les souches recombinantes utilisées peuvent également comprendre plusieurs cassettes ou vecteurs de l'invention, de sorte qu'elles produisent simultanément plusieurs toxines. Ce mode de réalisation permet

avantageusement de réduire en plus le nombre de fermentations dans le procédé de fabrication.

5 La production peut être réalisée dans les conditions de culture décrites ci-avant, en fermenteurs allant de 50 à 1500 litres. Lorsque les surnageants contenant les toxines ont été produits, ils sont soumis à différents traitements.

10 b) Récolte des surnageants

Les surnageants sont récoltés par les techniques classiques de la biologie, bien connues de l'homme du métier. En particulier, les surnageants peuvent être récupérés par simple filtration permettant de séparer les cellules.

15 c) Traitement des surnageants

De manière facultative, pour améliorer la qualité de la préparation finale, il est possible de soumettre les surnageants à des traitements supplémentaires tels que filtrations, centrifugations, concentrations, etc. Ces traitement
20 permettent de clarifier les surnageants, et d'effectuer une purification partielle des toxines. Ces techniques sont connues de l'homme du métier. Par ailleurs, dans le cas de vaccins polyvalents, différents surnageants peuvent être regroupés à ce stade.

25 d) Inactivation des toxines

Pour préparer une préparation immunogène efficace, il est bien entendu important que l'antigène utilisé soit dépourvu de la toxicité de la toxine contre laquelle une protection est recherchée. Dans le but de générer ces toxines
30 inactivées (toxoides), différentes techniques sont envisageables (Rappuoli et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 108 (1995) 327-333).

. Inactivation chimique

L'inactivation de toxines par voie chimique a été décrite depuis assez longtemps, et continue d'être utilisée aujourd'hui pour de nombreuses préparations immunogènes. Ainsi, dans le but d'inactiver les toxines bactériennes sans affecter trop leurs propriétés immunogènes, les surnageants selon le procédé de l'invention peuvent être traités par les composés suivants : formol, β -propiolactone, iode, formaldéhyde ou glutaraldéhyde. Les conditions et doses plus précises utilisables sont connues de l'homme du métier, et ont été décrites par exemple par Rappuoli R. (In Woodrow GC, Levine MM (eds): New Generation Vaccines. New York, Dekker, 1990 p.251-268), incorporée à la présente par référence.

. Inactivation physique

L'inactivation des toxines peut également être réalisée par voie physique, par exemple par irradiation.

. Inactivation par haute pression

L'inactivation peut encore être effectuée par traitement haute pression.

. Inactivation génétique

Une autre approche pour l'inactivation des toxines repose sur la modification génétique de leur structure primaire. Dans ce cas, les produits libérés dans le surnageant sont déjà des toxoïdes, et il n'est pas nécessaire d'effectuer une étape supplémentaire d'inactivation. L'inactivation (ou détoxification) génétique consiste essentiellement à modifier les acides nucléiques codant pour les toxines, de sorte que un ou plusieurs acides aminés sont changés et en ce que la protéine produite soit dépourvue de toxicité. Par exemple, il est possible de remplacer des acides aminés impliqués dans l'activité enzymatique, et donc dans la toxicité, par des acides aminés différents

dépourvus de cette activité. Il est également possible de déléter des régions de la toxine, de manière à fabriquer des fragments non-toxiques, immunogènes. Cette stratégie peut notamment être mise en oeuvre lorsque des épitopes des toxines ont été identifiés (par exemple par "epitope scanning") ou sont identifiables (par exemple à partir d'un profil d'hydrophobicité). Cette stratégie peut également être appliquée à la production de fragments (par exemple tryptiques) dont l'absence de toxicité a été mise en évidence. Par ailleurs, la modification génétique peut également être réalisée par mutagenèse au hasard, et sélection des clones produisant un toxoïde. Une telle stratégie a déjà été mise en oeuvre avec succès pour produire des toxoïdes de la toxine diphtérique par mutagenèse au moyen de nitrosoguanidine (NTG) (Giannini et al., Nucleic Acids Res. 12 (1984) 4063-4069). Par ailleurs, la production de toxoïdes par mutagenèse site-spécifique a également été réalisée avec succès à partir des gènes des toxines pertussique et cholérique (Pizza et al., Science 246 (1989) 497-500 ; Pizza et al., J. Exp. Med. 6 (1994) 2147-2153 ; Fontana et al., Infect. Immun. 63 (1995) 2356-2360).

Les toxoïdes ainsi produits sont ensuite utilisés directement pour la préparation des compositions vaccinales.

e) Formulation

Les toxoïdes sont généralement conditionnés selon les techniques classiques de la pharmacopée, de manière appropriée à un usage vaccinal. Préférentiellement, les toxoïdes sont formulés en présence d'adjuvants ou d'excipients, adaptés à la réalisation de solutés injectables. En particulier, l'injection est avantageusement réalisée par voie sous-cutanée ou systémique. Les doses d'antigène (toxoiïde) utilisées sont généralement celles assurant la meilleure protection sans induire de réaction secondaire significative. Les conditions et sites d'injection, ainsi que les techniques de détermination des doses sont illustrées en détails dans la pharmacopée (Vaccinum Clostridii Perfringentis, Chap. 363).

L'invention concerne également toute préparation immunogène comprenant une toxine produite dans une souche recombinant telle que définie ci-avant.

- 5 L'invention concerne plus particulièrement toute préparation immunogène comprenant un toxoïde de la toxine Béta2 recombinante, éventuellement associée à d'autres toxoïdes.

- 10 La présente invention sera décrite plus en détails à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des Figures

- 15 Figure 1 : Stratégie de clonage du gène complet de la toxine Béta2 de *C. perfringens*. H, HindIII ; S, Sau3A.
- Figure 2 : Représentation schématique du vecteur pMRP268
- Figure 3 : Représentation schématique du vecteur pMRP353
- Figure 4 : Représentation schématique d'un plasmide portant le promoteur Béta2
- 20 Figure 5 : Analyse en SDS-PAGE et Western Blot de la toxine Béta2 recombinante purifiée : (A) Gel SDS (0,1%)-PAGE (10%) coloré au bleu de coomassie de la toxine recombinante Béta2 (4,5 µg); (B) Western blot correspondant obtenu avec des anticorps anti-béta2.
- 25 Figure 6 : Etude de la toxicité de la toxine Béta2 purifiée sur les cellules I407. Photos prises au microscope à contraste de phases de cellules I407 controle (A) ou traitées par 20 µg/ml de toxine Béta2 (C) pendant 18 heures. (B) et (D) : visualisation du cytosquelette d'actine.
- 30 Figure 7 : Sensibilité de la toxine Béta2 à la trypsine. La toxine Béta2 (165 µg/ml) a été incubée sans (ligne 7) ou avec 16 ng/ml (ligne 1), 160 ng/ml (ligne 2), 400 ng/ml (ligne 3), 1,6 µg/ml (ligne 4), 4 µg/ml (ligne 5) et 16 µg/ml (ligne 6) de trypsine.

Figure 8 : Profil d'hydrophobicité de la toxine Béta2.

Liste des Séquences

- 5 SEQ ID n° 1 : Séquence du gène de la toxine Beta2 de Clostridium
Perfringens type C
SEQ ID n° 2 : Séquence du promoteur du gène de la toxine Beta2 de
Clostridium Perfringens type C
SEQ ID n° 3 : Séquence du signal de sécrétion du gène de la toxine Beta2
10 de Clostridium Perfringens type C
SEQ ID n° 4 : Séquence de l'amorce P318
SEQ ID n° 5 : Séquence de l'amorce P292

Matériels et Méthodes

15

1. Souches et ADNs bactériens utilisés.

Les souches bactériennes utilisées sont mentionnées dans les Tableaux 1 et
2. Les souches de Clostridium ont été cultivées en présence de Trypticase
20 (30 g/litre), extrait de levure (20 g/litre), glucose (5 g/litre) et cystéine-HCl
(0,5 g/litre), pH 7,2 (milieu TGY) à 37°C en conditions anaérobies.
L'ADN total et l'ADN plasmidique de Clostridium ont été extraits et purifiés
selon la technique décrite par Perelle et al. (Infect. Immun. 61 (1993) 5147-
5156).

25 Les plasmides pUC19 et pUC18 (Appligene, Strasbourg, France) ont été
utilisés pour les expériences de clonage dans E. coli TG1, et les vecteurs
navettes pAT19 (Trieu-Cuot et al., Gene 102 (1991) 99-104) et pJIR750
(Bannan et Rood, Plasmid 229 (1993) 233-235) ont été utilisés pour les
expériences de clonage et d'expression dans Clostridium, notamment dans
30 Clostridium perfringens 667-76, une souche négative pour la lécithine.

2. Les oligonucléotides synthétiques et les expériences d'hybridation ont été
réalisées dans les conditions décrites dans Perelle et al, 1993 (supra).

3. Les expériences d'amplification par PCR ont été réalisées dans un volume total de 100 µl en utilisant 100 ng d'ADN comme décrit précédemment (Perelle et al, 1993, supra).

5

4. Les ligatures et transformations ont été effectuées selon les protocoles standard de la biologie moléculaire (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

10

5. La purification de la toxine Beta2 et son microséquençage ont été réalisés selon le protocole décrit dans la demande internationale n° WO95/17521.

6. La cytotoxicité a été déterminée selon le test suivant : Les cellules
15 intestinales I407 (ATCC) ont été cultivées en milieu Dulbecco modifié (DMEM) supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal. Les cellules I407 ont été étalées sur des plaques de culture 96 puits (Falcon, Becton Dickinson) et cultivées pendant 24 heures à 37°C dans un incubateur à 5% CO₂ pour obtenir des monocouches. Des dilutions en série d'un facteur 2 d'échantillons
20 de volume final 100 µl ont été ajoutées aux monocouches. Les cellules ont été examinées après 18 heures d'incubation, pour détecter tout changement de morphologie. Le cytosquelette d'actine a été visualisé par immunofluorescence au moyen de phalloïdine isothiocyanate fluorescente (1 µg/ml, Sigma) selon la technique décrite par Giry et al. (Infect. Immun. 63
25 (1995) 4063-4071).

Exemples

A - Clonage du gène complet de la toxine Beta2 de Clostridium 30 Perfringens type C

Cet exemple décrit le clonage du gène complet de la toxine Béta2, c'est-à-dire incluant les signaux en 5' de régulation et d'adressage.

Un fragment de 676 pb comprenant essentiellement la région codant pour la forme mature de la protéine a été isolé par amplification en utilisant les amorces P279 et P280 déduites du microséquençage de la protéine (WO95/17521). Ce fragment ne comporte pas le gène complet, dans la mesure où aucun signal de régulation en 5' du gène n'est présent. En outre, l'existence de séquences d'adressage n'est pas divulguée ni déductible de ce fragment. Dans le but de cloner le gène complet, les inventeurs ont dans un premier temps utilisé ce fragment comme sonde pour isoler, par hybridation à partir d'une banque génomique, un fragment de taille supérieure comportant la région 5'. Aucune de ces expériences n'a cependant permis de détecter ni, a fortiori, d'obtenir un fragment correspondant, quelles que soient les conditions d'hybridation utilisées. Les inventeurs ont donc imaginé une stratégie différente pour tenter d'isoler un fragment portant les régions 5' du gène. A cet égard, les inventeurs ont dans un premier temps circularisé la matrice servant à l'amplification, et procédé à une amplification par PCR inverse sur l'ADN ainsi obtenu, en utilisant les amorces P292 et P318, dont la séquence est la suivante :

P318 : 5'-GAAATGTTTACAACGTATTAATATCGTAG-3' (SEQ ID n° 4)
P292 : 5'-TCAAGTTTGTACATGGGATGATG-3' (SEQ ID n° 5)

La localisation de ces amorces sur le gène est indiquée dans la séquence SEQ ID n°1. La stratégie de clonage est représentée sur la Figure 1. Le fragment amplifié ainsi obtenu a ensuite été sous cloné dans le plasmide pUC18 coupé par SmaI, pour générer le vecteur pMRP224 (Figure 1).

La séquence complète du fragment ainsi obtenu, de 1392 pb, est représentée sur la séquence SEQ ID n° 1.

30

B - Identification des régions promotrices

La séquence obtenue dans l'exemple A (SEQ ID n° 1) comporte une phase ouverte de lecture, codant pour la toxine Béta2 mature (résidus 358 à 1122), et des régions régulatrices ou d'adressage situées en 5' et en 3'. La région promotrice du gène de la toxine Beta2 de Clostridium Perfringens type C
5 peut être localisée sur cette séquence comme comprenant les résidus 1 à 267. Cette séquence du promoteur du gène de la toxine Beta2 de Clostridium Perfringens type C est présentée séparément sur la séquence SEQ ID n° 2. Cette séquence comporte notamment un site consensus de fixation des ribosomes (GGGGGG) localisé 7 nucléotides en amont du codon d'initiation
10 ATG, soit aux positions 255-260 de la séquence SEQ ID n° 2.

Cette région, ou tout fragment ou variant de celle-ci, peut être isolée à partir d'échantillons d'acides nucléiques de clostridium en utilisant les sondes appropriées (par exemple correspondant à la séquence SEQ ID n° 2 ou un
15 fragment de celle-ci), ou par synthèse chimique, ou par digestion enzymatique à partir des plasmides de l'invention, notamment du plasmide pMRP268, déposé le 8 août 1997 à la collection de l'Institut Pasteur (CNCM) sous le numéro I-1911.

20 L'activité de promoteur transcriptionnel de cette région ou des fragments ou variants peut être contrôlée de différentes manières, et notamment par insertion de cette région en amont d'un gène reporteur, et vérification de la présence du produit de transcription ou de traduction dudit gène reporteur dans un hôte cellulaire approprié, notamment une bactérie du genre
25 Clostridium, plus préférentiellement C. Perfringens.

Le gène reporteur peut être par exemple le gène LacZ ou encore le gène codant pour la luciférase.

30 La construction de telles cassettes d'expression ou vecteurs est illustrée dans les exemples D et suivants, ainsi que les conditions de transformation de différents hôtes cellulaires.

C - Identification des régions d'adressage

La séquence obtenue dans l'exemple A (SEQ ID n° 1) comporte en plus d'une phase ouverte de lecture et de régions régulatrices de la transcription (exemple B) des signaux d'adressage permettant de diriger une protéine ou un peptide en cours de synthèse, vers les voies de sécrétion de la cellule hôte. La région d'adressage (peptide signal de sécrétion) du gène de la toxine Beta2 de *Clostridium Perfringens* type C peut être localisée sur la séquence SEQ ID n° 1 comme comprenant les résidus 268 à 357. Cette séquence du peptide signal du gène de la toxine Beta2 de *Clostridium Perfringens* type C est présentée séparément sur la séquence SEQ ID n° 3. Cette région code pour 30 acides aminés, comportant une région hydrophobe (résidus 6-26), formant vraisemblablement un domaine transmembranaire, bordée par des acides aminés chargés (Lys2, Lys3, Lys7 et Lys27). Par ailleurs, la région de jonction entre cette séquence signal et la protéine mature (Ala30-Lys31) correspond au site de clivage (Ala-X) de la majeure partie des signal peptidases bactériennes.

Cette région, ou tout fragment ou variant de celle-ci, peut être isolée à partir d'échantillons d'acides nucléiques de *clostridium* en utilisant les sondes appropriées (par exemple correspondant à la séquence SEQ ID n° 3 ou un fragment de celle-ci), ou par synthèse chimique, ou par digestion enzymatique à partir des plasmides de l'invention, notamment du plasmide pMRP268, déposé le 8 août 1997 à la collection de l'Institut Pasteur (CNCM) sous le numéro I-1911.

L'activité de séquence signal de cette région ou des fragments ou variants peut être contrôlée de différentes manières, et notamment par insertion de cette région en amont d'un gène reporteur, et vérification de la présence du produit de traduction dudit gène reporteur dans le surnageant de culture d'un hôte cellulaire approprié, notamment une bactérie du genre *Clostridium*, plus préférentiellement *C. perfringens*.

La construction de cassettes d'expression ou vecteurs comportant ce type de signal de sécrétion est illustrée dans les exemples qui suivent, ainsi que les conditions de transformation de différents hôtes cellulaires.

5 **D - Construction de cassettes d'expression et de vecteurs**

Les régions de régulation et d'adressage décrites dans l'invention peuvent être insérées dans tout vecteur d'expression classique, ou utilisées pour la construction de cassettes d'expression.

10

Ces cassettes et vecteurs sont particulièrement adaptés à l'expression (et éventuellement la sécrétion) de protéines recombinantes dans des bactéries du genre *Clostridium*, notamment *Clostridium perfringens*. Il est entendu que tout autre type cellulaire dans lequel ces régions sont fonctionnelles peut être utilisé. Ces régions sont particulièrement avantageuses pour l'expression de toxines bactériennes, notamment de toxines de bactéries du genre *Clostridium*. La construction de cassettes et vecteurs appropriés est décrite ci-dessous.

15

20

D1. Construction du vecteur pMRP268 (Figure 2)

Le vecteur pMRP268 porte les éléments suivants :

- une origine de réplication OriR permettant sa réplication dans une bactérie *E. coli*,

25

- une origine de réplication OriT permettant sa réplication dans une bactérie du genre *Clostridium*,

- deux gènes marqueur (*orfE* et *erm*), permettant la sélection des transformants chez *E. coli* et *Clostridium*,

30

- une cassette d'expression comportant, dans le sens 5'→3', le promoteur du gène de la toxine Béta2 de *Clostridium perfringens*, le signal de sécrétion du gène de la toxine Béta2 de *Clostridium perfringens*, et la séquence codant pour la toxine Béta2 de *Clostridium perfringens*.

Ce vecteur a été construit à partir du plasmide pAT19, par introduction de la cassette d'expression au niveau du multisite de clonage. Plus particulièrement, la cassette a été obtenue par amplification du gène de la Béta2 de *C. perfringens* de séquence SEQ ID n° 1 au moyen des amorces
5 P385 et P393, dont la séquence et la position sont représentées sur la séquence SEQ ID n° 1, en utilisant la Vent Polymerase (Biolabs) selon les recommandations du fabricant. Le produit d'amplification résultant a été inséré aux sites EcoRI-PstI du plasmide pAT19. La souche *C. perfringens* 667-76 n'exprimant pas la lécithine et contenant le plasmide pMRP268 a été
10 déposée à la CNCM, Institut Pasteur, le 8 août 1997 sous la référence I-1911.

D2. Construction du vecteur pMRP353 (Figure 3)

- 15 Le vecteur pMRP353 porte les éléments suivants :
- une origine de répllication OriR permettant sa répllication dans une bactérie *E. coli*,
 - une origine de répllication OriT permettant sa répllication dans une bactérie du genre *Clostridium*,
 - 20 - deux gènes marqueur (*orfE* et *erm*), permettant la sélection des transformants chez *E. coli* et *Clostridium*,
 - une cassette d'expression comportant, dans le sens 5'→3', le promoteur du gène de la toxine Béta2 de *Clostridium perfringens*, le signal de sécrétion du gène de la toxine Béta2 de *Clostridium perfringens*, et la
25 séquence codant pour la toxine Béta1 de *Clostridium perfringens*.

Ce vecteur a été construit à partir du plasmide pMRP268, par substitution de la séquence codant pour la toxine Béta2 de *Clostridium perfringens* par celle codant pour la toxine Béta1. L'ADNc codant pour la toxine Béta1 a été
30 obtenu par amplification à partir de la souche NTCT8533 (Tableau 1) au moyen d'amorces introduisant un site NcoI à l'extrémité 5' (P321) et un site PstI à l'extrémité 3' (P322).

D3. Construction d'un vecteur utilisable pour l'expression de tout ADNc

Il est entendu que les vecteurs décrits en D1 et D2 ci-dessus peuvent être
5 utilisés pour l'expression de tout ADN d'intérêt sous le contrôle d'une région
promotrice provenant du gène Béta2, par substitution de la séquence
codante, comme illustré dans l'exemple D2. En outre, des vecteurs
équivalents peuvent être construits à partir d'autres squelettes plasmidiques
classiques, portant d'autres origines de réplifications et marqueurs de
10 sélection.

La Figure 4 représente un vecteur portant le promoteur du gène Béta2 de
Clostridium perfringens, suivi d'un multisite de clonage permettant
l'introduction de tout ADNc d'intérêt.

15

E - Production et purification de la protéine Beta2 recombinante dans Clostridium.

Le plasmide pMRP268 a été introduit dans la souche C. perfringens 667-76
20 par électroporation (Perelle et al., 1993). La souche recombinante a été
cultivée pour une nuit dans du milieu TGY contenant 30 µg/ml
d'érythromycine, en conditions anaérobies à 37°C. Le surnageant de culture
a ensuite été précipité par saturation en présence de sulfate d'ammonium à
60%. Le précipité a été dialysé contre 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, et chargé
25 sur une colonne de DEAE Sépharose CL6B. La colonne a ensuite été lavée
et éluée en présence de NaCl 0,1 M dans le même tampon. Le matériel élué
a été dialysé contre du PIPES-HCl 10 mM, pH 6,5, puis chargé sur une
nouvelle colonne de DEAE Sépharose CL6B équilibrée avec le même
tampon. Après lavage, la colonne a été éluée avec un gradient 0-0,1 M de
30 NaCl dans un tampon PIPES. Les fractions contenant la toxine Béta2
recombinante purifiée ont été concentrées. Le poids moléculaire apparent de
la protéine recombinante, déterminé par SDS-PAGE, est de 28 kDa, ce qui

est en accord avec le poids moléculaire calculé d'après la séquence (Figure 5).

Les résultats obtenus montrent donc :

- 5 - qu'il est possible de produire et de sécréter une toxine recombinante dans *Clostridium*, sous contrôle du promoteur Béta2,
- que la toxine recombinante peut être purifiée,
- que la structure de la toxine recombinante ne semble pas altérée,
- 10 - que les niveaux d'expression obtenus sont supérieurs d'un facteur 10 à ceux observés dans une souche sauvage de *Clostridium*.

Une expérience a été réalisée dans les conditions similaires, mais en introduisant le vecteur d'expression non pas dans la souche 667-76 (qui ne produit pas la toxine Béta2), mais dans une souche sauvage de *Clostridium*.

- 15 Les résultats obtenus montrent que la présence de vecteurs de l'invention dans les souches de *Clostridium* permet d'augmenter les niveaux de production de la toxine Béta2 d'un facteur 40 à 80.

Ces résultats témoignent des avantages fournis par la présente invention.

- 20 Ainsi, la possibilité de produire, à des niveaux importants, dans une souche de *Clostridium*, différents types de toxines, permet d'améliorer le pouvoir immunogène de ces surnageants, d'élargir la gamme de vaccins à des toxines faiblement produites de manière naturelle, et de simplifier la production industrielle de compositions vaccinales.

25

F - Production de la protéine Beta1 recombinante dans *Clostridium*.

- 30 Le plasmide pMRP353 a été introduit dans la souche *C. perfringens* 667-76 par électroporation (Perelle et al., 1993). La souche recombinante a été cultivée pour une nuit dans du milieu TGY contenant 30 µg/ml d'érythromycine, en conditions anaérobies à 37°C. Le surnageant de culture est traité comme dans l'exemple E.

Cette expérience permet de mettre en évidence la présence de Béta1 recombinante dans les surnageants.

Cet exemple illustre donc la capacité des constructions de l'invention à
5 produire et à sécréter des toxines hétérologues (i.e. différentes de Béta2 ou provenant d'organismes pathogènes autres que *C. perfringens*) dans les souches de *Clostridium*.

G - Production de compositions immunogènes

10 Comme indiqué ci-avant, la présente invention permet dorénavant de produire, à des niveaux importants, dans une souche de *Clostridium*, différents types de toxines pouvant entrer dans la compositions de vaccins. L'invention permet ainsi d'améliorer le pouvoir immunogène de ces vaccin,
15 d'élargir la gamme des vaccins à des toxines faiblement produites de manière naturelle, et de simplifier la production industrielle de compositions vaccinales.

En particulier, la présente invention permet de produire des vaccins
20 contenant un toxoïde de la toxine Béta2, c'est-à-dire une forme inactivée, permettant d'induire une protection améliorée contre les infections par *Clostridium*. Les avantages de telles compositions sont notamment illustrés par la démonstration des propriétés toxiques importantes de la toxine Béta2.

G1. Propriétés de la toxine Beta 2 purifiée recombinante

La toxine Béta2 purifiée a été injectée, par voie intraveineuse, à des souris. Les résultats obtenus montrent que cette toxine est létale pour des souris, à des doses inférieures à 3 µg. En outre, les résultats présentés sur la Figure 6
30 montrent que la toxine Béta 2 est également toxique pour les cellules I407. Par ailleurs, l'effet d'un traitement de la béta2 par la trypsine sur l'activité de cette toxine a été évalué. Comme indiqué sur la Figure 7, la trypsine, à 16 ng/ml, clive la toxine béta2 en un constituant de 24 kDa, et à plus fortes

concentrations, en deux peptides de 13 et 15 kDa. Les tests de cytotoxicité effectués avec ces produits de digestion trypsique montrent une absence totale de toxicité. De ce fait, la trypsine induit une perte de toxicité de la toxine bêta2, et les peptides ainsi générés peuvent être utilisés comme toxoïdes.

Afin de déterminer l'importance de la toxine Bêta2 dans la pathogénicité de Clostridium, la présence du gène correspondant a été analysée dans 57 souches de clostridium différentes (Tableaux 1 et 2). Les résultats obtenus montrent que certaines souches de Clostridium de type B et C portent le gène Bêta2. En outre, parmi 27 souches isolées à partir de porcelets présentant des lésions de type nécroses à entérocolis, 44% portent le gène bêta2. De plus, seul le gène Bêta2 a été détecté dans toutes les souches isolées à partir de chevaux mourant des symptômes de colites et dans lesquels Clostridium perfringens a été récoltée en quantité élevée (supérieure à 10^6 /g) dans les extraits intestinaux. Ces résultats illustrent la corrélation entre la toxine bêta2 et certaines pathologies animales, et l'intérêt de pouvoir générer des compositions vaccinales dont l'un des antigènes est un toxoïde de la toxine bêta2, notamment pour la vaccination des porcelets et des chevaux.

G2. Production de compositions immunogènes

Cet exemple illustre la production de compositions immunogènes ou vaccinales destinées à protéger les organismes concernés des infections par des souches pathogènes bactériennes.

a) Compositions polyvalentes ou monovalentes

Comme indiqué ci-avant, des compositions vaccinales peuvent être monovalentes (dirigées contre une seule toxine) ou polyvalentes (dirigées contre plusieurs toxines). Les vaccins disponibles sur le commerce sont généralement polyvalents (Miloxan, Gletvax5). Des compositions immunogènes préférées au sens de l'invention sont également polyvalentes.

Avantageusement, les compositions immunogènes de l'invention comprennent au moins un toxoïde recombinant produit dans une cellule recombinante de l'invention. Une autre composition immunogène préférée au sens de l'invention comprend avantageusement un toxoïde de la toxine bêta2
5 de *C. perfringens*. Les compositions immunogènes de l'invention peuvent comporter en outre toute toxine mentionnée précédemment.

b) Production d'une composition immunogène contre la toxine Béta2.

10 Pour préparer une telle composition, le surnageant de culture de la souche *C. perfringens* transformée par le vecteur pMRP268 (exemple E) est récolté par les techniques classiques. Ce surnageant est centrifugé, puis filtré et concentré afin d'obtenir une préparation enrichie en toxines bêta recombinantes. Cette préparation est ensuite soumise à un traitement par le
15 formol afin d'inactiver les toxines présentes. L'efficacité du traitement est contrôlée par incubation de cellules I407 en présence d'un échantillon de cette préparation.

Cette préparation peut ensuite être utilisée comme immunogène pour
20 induire, dans un organisme, la production d'anticorps. La capacité des anticorps produits à inhiber une infection par des souches pathogènes de *Clostridium* peut ensuite être déterminée, comme décrit dans la Pharmacopée (*Vaccinum Clostridium Perfringens*).

25 c) Production d'une composition immunogène polyvalente

Pour préparer une telle composition, la préparation enrichie obtenue dans l'exemple b) ci-dessus est mélangée, avant ou après inactivation, avec un ou
30 plusieurs autres surnageants de culture ou préparation dérivée comprenant une toxine ou un toxoïde correspondant, tel que par exemple un toxoïde pertussique, cholérique et/ou tétanique. La préparation résultante est ensuite contrôlée et utilisée comme décrit dans l'exemple b).

TABLEAU 1

Souches de <i>C. perfringens</i> de Type C	Présence du gène de la toxine Beta2
NCTC8533	-
NCTC6121	-
ATCC3628	-
NCTC8081	-
NCTC3180	+
NCTC3182	+

5

TABLEAU 2

10

Isolats de	Clostridium Totaux	Présence des gènes		
		cpb2+, cpb1-	cpb2+, cpb1+	cpb2-, cpb1-
Porcelets	27	12	12	1
Chevaux	15	16	0	0
Aliments	15	2	0	0

cpb2 : Gène de la toxine bêta2 ; cpb1 : Gène de la toxine bêta1

Séquence SEQ ID n° 1

1 ATTTGGGATATCTTAAATTTAGCACAGAAGAATGTTTAAATGAAATAAAGATAATAAAAA
-----> P385
61 GATATATTAATTATATAGCTGAAAATTTATAATTATATGATAAGTATAGTTAATAAATAA
121 AAAGTGTTCCTCGGGGACACTTTTTTGTGTTTAAAAAGGAAAATATAAATAAAATTTAGAT
181 AAAAGTGTAATAATTATTTTTTATTTTAAATTTGTGTTAAAAATTTGATATAATTGAATTG
241 TAAAAAAAATTCAGGGGGAATATAAATGAAAAAATTATTTCAAAGTTTACTGTAATT
1 M K K I I S K F T V I
301 TTTATGTTTTTCATGTTTTCTTATTGTTGGAGCAATAAGTCCAATGAAAGCAAGTGCAAAA
12 F M F S C F L I V G A I S P M K A S A K
361 GAAATCGACGCTTATAGAAAGGTAATGGAGAATTATCTTAATGCTTTAAAAAACTACGAT
32 E I D A Y R K V M E N Y L N A L K N Y D
421 ATTAATACAGTTGTAAACATTTTCAGAAGATGAAAGAGTAAATAATGTTGAACAGTATAGA
52 I N T V V N I S E D E R V N N V E Q Y R
481 GAAATGTTAGAAGATTTTAAATATGATCCTAACCAACAAGTAAATCTTTTGAAATACTT
72 E M L E D F K Y D P N Q Q L K S F E I L
541 AATTCACAAAAGAGCGATAATAAAGAAATATTTAATGTAAAAACTGAATTTTAAATGGTO
92 N S Q K S D N K E I F N V K T E F L N G
601 GCAATTTATGATATGGAATTTACTGTATCATCTAAAGATGGAAAATTAATAGTATCTGAT
112 A I Y D M E F T V S S K D G K L I V S D
661 ATGGAAAGAACAAAAGTTGAGAATGAAGGAAAATATATTTTAAACACCATCATTTAGAAGT
132 M E R T K V E N E G K Y I L T P S F R T
721 CAAGTTTGTACATGGGATGATGAAGTACAGCAAGCAATTGGGGGAGTTTATCCACAAACA
152 Q V C T W D D E L A Q A I G G V Y P Q T
781 TATTCTGATAGATTTACATATTATGCAGATAATATATTATTAACTTCAGACAATATGCA
172 Y S D R F T Y Y A D N I L L N F R Q Y A
841 ACTTCAGGTTCAAGAGATTTAAAAGTAGAATATAGTGTTGTAGATCATTGGATGTGGAAA
192 T S G S R D L K V E Y S V V D H W M W K
901 GATGATGTTAAAGCTTCTCAAATGGTATATGGTCAAATCCTGATTCTGCTAGACAAATA
212 D D V K A S Q M V Y G Q N P D S A R Q I
961 AGATTATATATAGAAAAAGGACAATCTTCTATAAATATAGAATAAGAATTAAAACTTT
232 R L Y I E K G Q S F Y K Y R I R I K N F
1021 ACACCTGCATCAATTAGAGTATTTGGTGAAGGTATTGTGCATAGAAAAAATATGAAGT
252 T P A S I R V F G E G Y C A * <-----
1081 GACTTAGTCACTTCATATTTTTTTTACTATTAATTTTATTATATAAAAACCTAACATACA
----->
1141 TGAAAGTATTCTTAATACAGTTATATCAAAATTAAGTAGGGGAAATAAAATAAAAGGCT
1201 AAAAAGTATATTAATAAACTATAAAATTTATTAATTAAGGTTTAAAGGTGTTATTTATT
1261 TATGATTATAGGAATAAATATGCCAAATGGAATAAATAAAAGTAATATTAATAATTGGTC
1321 TAAAAAGTATACATCATTGATAAAAGAAAATTACCAGTAAAAATTGAGCTTAAAAATT
P393 <-----
1381 AAATGTAAATTT 1392

```

1   ATTTGGGATATCTTAAATTTAGCACAGAAGTGTAAATGAAATAAAGATAATAAAAA
    -----> P385
61  GATATATTAATTATATAGCTGAAAATTTATAATTATATGATAAGTATAGTTAATAAATAA
121 AAAGTGTTCTCGGGGGACACTTTTTTGTTTTAAAAAGGAAAATATAAATAAAATTTAGAT
181 AAAAGTGTAATAATAATTATTTTATTTTAAATTTGTTAAAAATTTGATATAATTGAATTG
241 TAAAAAAATTTTCAGGGGGGAATATAAATGAAAAAATTATTTCAAAGTTTACTGTAATT
    1
301 TTTATGTTTTTCATGTTTTCTTATTGTT

```

10

M K K I I S K F T V I
GGAGCAATAAGTCCAATGAAAGCAAGTGCAAAA
F M F S C F L I V G A I S P M K A S A
GAAATCGACGCTTATAGAAAGGTAATGGAGAATTATCTTAATGCTTTAAAAAACTAC

15

Séquence SEQ ID n° 4

P318 : 5'-GAAATGTTTACAACGTATTAATATCGTAG-3'

20

Séquence SEQ ID n° 5

P292 : 5'-TCAAGTTTGTACATGGGATGATG-3'

25

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il présente une activité de promoteur transcriptionnel et en ce qu'il comprend :
- 5 (a) tout ou une partie de la séquence SEQ ID n° 2 ou d'un variant de celle-ci, ou
- (b) une séquence hybridant avec tout ou partie du brin complémentaire de la séquence SEQ ID n° 2.
- 10 2. Acide nucléique selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou une partie de la séquence SEQ ID n° 2.
3. Acide nucléique selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il s'agit du promoteur du gène de la toxine bêta 2 de *Clostridium perfringens* ou d'un
- 15 fragment de celui-ci.
4. Cassette d'expression d'un transgène caractérisée en ce qu'elle comprend, dans l'orientation 5' -> 3' :
- un acide nucléique selon la revendication 1, et,
- 20 - ledit transgène.
5. Cassette d'expression selon la revendication 4 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, en 3' du transgène, un terminateur transcriptionnel.
- 25 6. Cassette d'expression selon la revendication 4 ou 5 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, entre l'acide nucléique et le transgène, un signal de sécrétion.
7. Cassette d'expression selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisée en
- 30 ce que le transgène code pour une toxine ou un fragment ou variant de toxine.

8. Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que le transgène code pour une toxine ou un fragment ou variant de toxine d'une bactérie pathogène.
- 5 9. Vecteur comprenant un acide nucléique selon la revendication 1 ou une cassette d'expression selon la revendication 4.
10. Vecteur selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il est fonctionnel dans les bactéries.
- 10 11. Vecteur selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il est fonctionnel dans les bactéries du genre *Clostridium*, notamment dans les bactéries *Clostridium perfringens*.
- 15 12. Cellule recombinante comprenant un acide nucléique selon la revendication 1 ou une cassette d'expression selon la revendication 4 ou un vecteur selon la revendication 9.
- 20 13. Cellule selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule procaryote, de préférence une bactérie.
- 25 14. Procédé de production d'un polypeptide comprenant l'introduction dans une cellule hôte d'un transgène codant pour ledit polypeptide sous contrôle d'un promoteur tel que défini dans la revendication 1, puis la récupération dudit polypeptide.
- 30 15. Procédé de production d'un polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend la culture d'une cellule recombinante selon la revendication 12 comprenant une cassette d'expression selon la revendication 4 ou un vecteur selon la revendication 9, le transgène codant pour ledit polypeptide.
16. Procédé selon la revendication 14 ou 15 caractérisé en ce que la cellule est une bactérie du genre *Clostridium*.

17. Procédé selon l'une des revendications 14 à 16 pour la production d'une toxine ou d'un toxoïde.
- 5 18. Utilisation d'un acide nucléique selon la revendication 1 pour la production de polypeptides.
19. Acide nucléique comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 3.
- 10 20. Procédé de préparation d'une composition immunogène comprenant les étapes suivantes :
- a) l'expression d'une ou plusieurs toxines (ou toxoïdes correspondants) dans une cellule selon la revendication 12,
 - b) la récolte du surnageant,
 - 15 c) de manière facultative, le traitement du surnageant pour purifier ou concentrer la (les) toxine(s) ou toxoïde(s),
 - d) l'inactivation de la (des) toxine(s), et,
 - e) de manière facultative, le conditionnement de la (des) toxine(s) inactivée(s) ou du (des) toxoïde(s).
- 20 21. Composition immunogène comprenant un toxoïde d'une toxine produite selon le procédé de la revendication 17.
22. Composition immunogène comprenant un toxoïde de la toxine Béta2
- 25 recombinate.
23. Toxine Béta2 recombinate essentiellement purifiée.

ACIDES NUCLEIQUES, CELLULES RECOMBINANTES, ET PROCEDE DE
PREPARATION DE COMPOSITIONS IMMUNOGENES

5

10

ABREGE

15 La présente invention concerne de nouveaux acides nucléiques ayant
une activité de promoteur transcriptionnel. Elle concerne également un
procédé de préparation de polypeptides recombinants utilisant ces acides
nucléiques, ainsi que les cellules recombinantes contenant ces acides
nucléiques. L'invention concerne en outre un nouveau procédé de
20 préparation d'antigènes ou fragments d'antigènes, notamment de toxines
bactériennes, plus préférentiellement de toxines de *Clostridium*, en vue de la
préparation de compositions immunogènes et/ou vaccinales. Elle concerne
encore des compositions vaccinales ayant des propriétés améliorées.

25

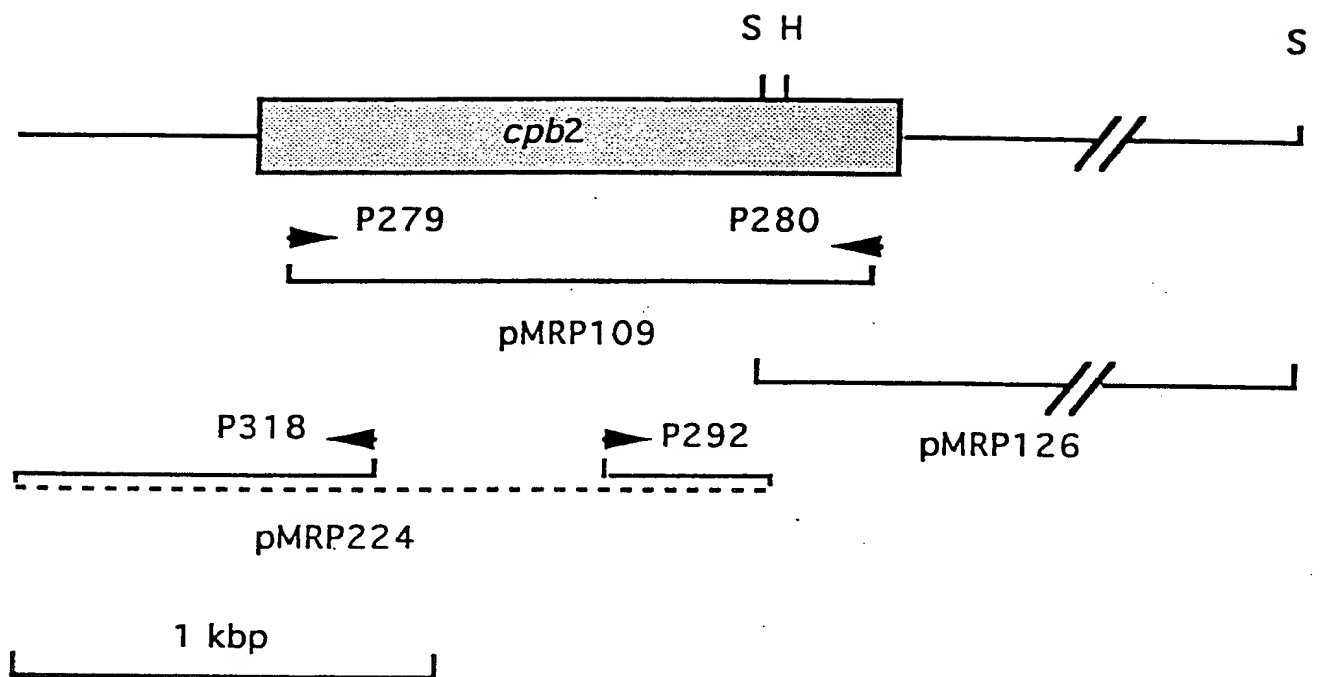


FIGURE 1

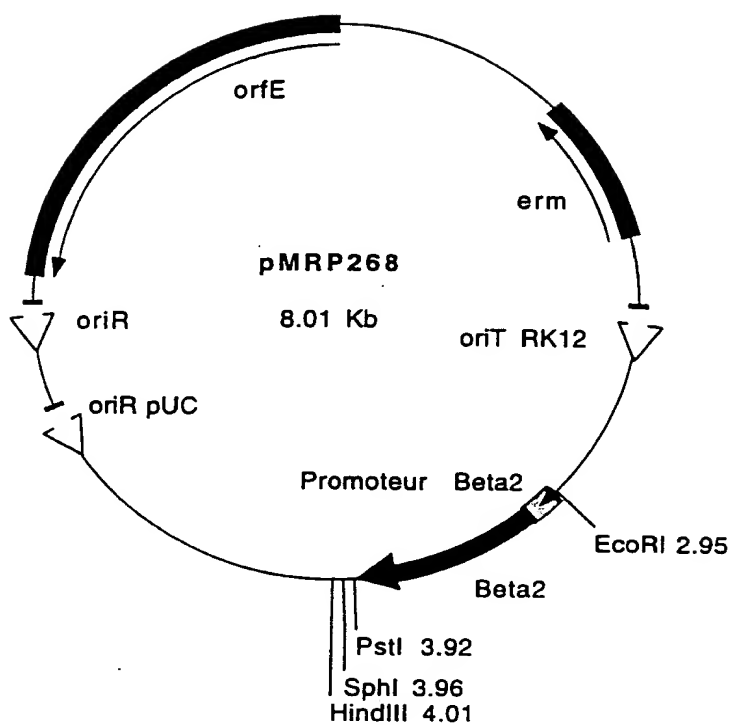


FIGURE 2

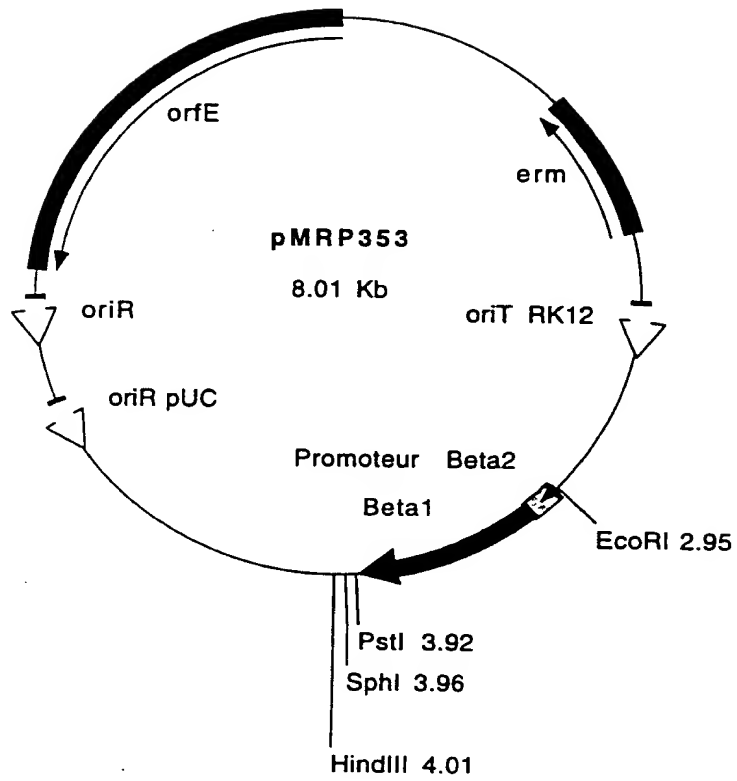


FIGURE 3

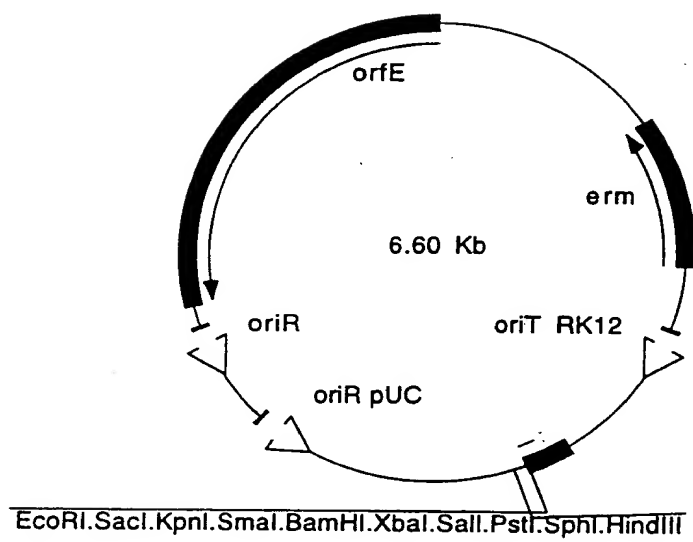


FIGURE 4



FIGURE 5

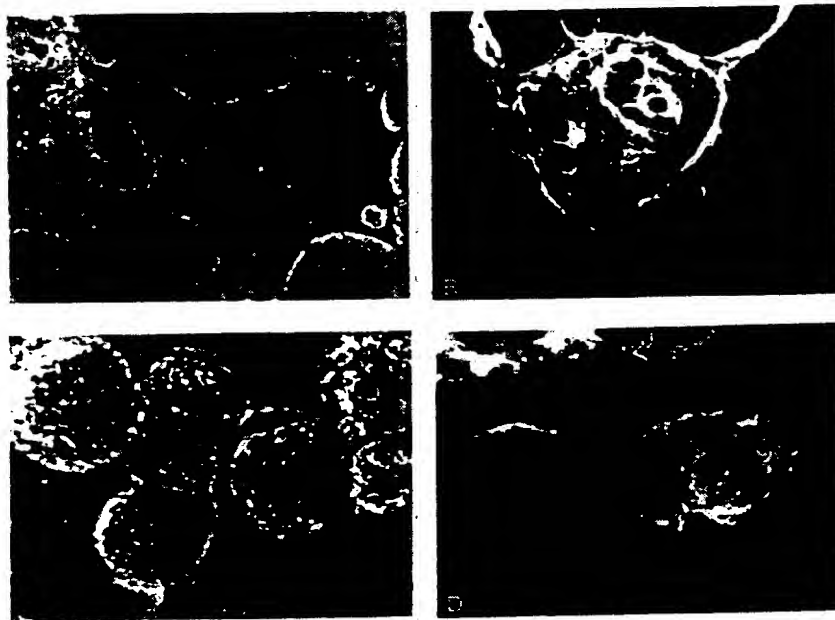


FIGURE 6

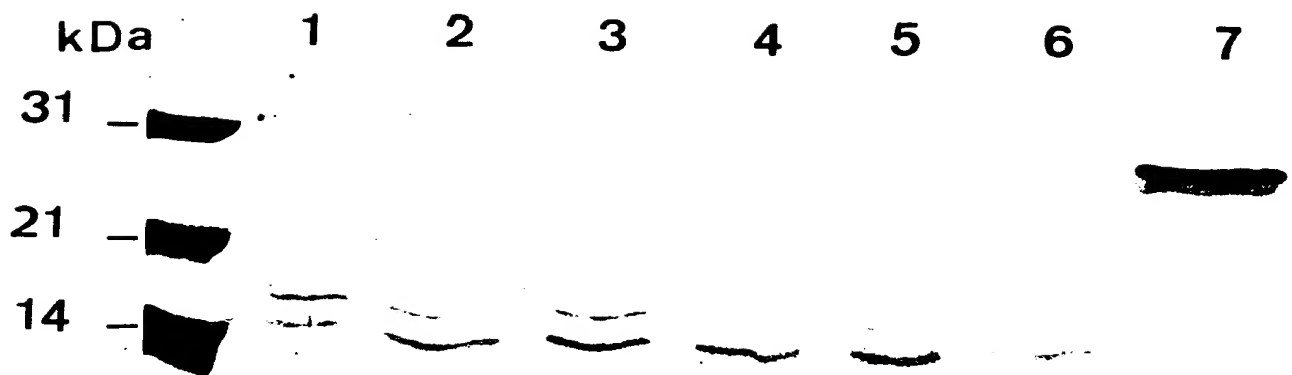


FIGURE 7

HYDROPHILIC IISKFTVIFMFCFLIVGA
 1 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 0 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 -1 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 -2 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 0 10 20 30 40 50 60
 ISPNKASAKEIDAYRK N LK VNISE
 VMENYL A NYDINTV

Index
 1 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 0 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 -1 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 -2 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 60 70 80 90 100 110 120
 HADROPHOBIC DERVN VEQYREMLEDFKYD NQ LK
 HYDROPHILIC N P Q SPEI EIF TEFLNGA Y MEF
 LNSQKSDNR NVK D TV

Index
 1 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 0 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 -1 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 -2 + ** u ** u ** u ** u ** u ** u **
 120 130 140 150 160 170 180
 HYDROPHOBIC SSKD VSDMERTKvene
 HYDROPHILIC GKLI GKYIL F TQV LAQAIGGVYP RFTYYA
 TPS R CTWDE QTYSD

FIGURE 8A

Index	2	1	0	-1	-2	180	190	200	210	220	230	240
HYDROPHOBIC	U	U	U	U	U	R	TSGSRDLK	VEYSVVDHW	MWQDDVK	GQNPDSAR	RLYIEK	QI
HYDROPHILIC	U	U	U	U	U	QYA				ASQMVY		QQS

Index	2	1	0	-1	-2	240	250	260
HYDROPHOBIC	U	U	U	U	U	P	R	*
HYDROPHILIC	U	U	U	U	U	I	NFT	ASI

FIGURE 8B

21 SEP. 1998

Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITE		<input type="checkbox"/> D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.		
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 19/09/1997	9711710	FRANCE		
(2)				
(3)				

☒ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : 1

* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii)). Voir le cadre supplémentaire.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE

Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) :

ISA /

Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; menti n de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) :

Date (jour/mois/année)

Numéro

Pays (ou office régional)

19/09/1997

FA550512

FRANCE

Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DEPOT

La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant :

requête : 5
description (sauf partie réservée au listing des séquences) : 30
revendications : 3
abrégé : 1
dessins : 9
partie de la description réservée au listing des séquences : 2
Nombre total de feuilles : 50

Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale :

1. ☐ feuille de calcul des taxes
2. ☐ pouvoir distinct signé
3. ☐ copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant :
4. ☐ explication de l'absence d'une signature
5. ☐ document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) :
6. ☐ traduction de la demande internationale en (langue) :
7. ☐ indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés
8. ☐ listing des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur
9. ☒ autres éléments (préciser) : Copie du Rapport de Recherche

Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :

Langue de dépôt de la demande internationale :

Français

Cadre n° IX SIGNATURE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE

A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.

Paris, le 16 septembre 1998

BECKER Philippe

ERNEST GUTMANN-
YVES PLASSERAUD S.A.

Réservé à l'office récepteur

1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale : 17 SEP. 1998 (17/09/1998)	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Réservé au Bureau international

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il présente une activité de promoteur transcriptionnel et en ce qu'il comprend :
- 5 (a) tout ou une partie de la séquence SEQ ID n° 2 ou d'un variant de celle-ci, ou
- (b) une séquence hybridant avec tout ou partie du brin complémentaire de la séquence SEQ ID n° 2.
- 10 2. Acide nucléique selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou une partie de la séquence SEQ ID n° 2.
3. Acide nucléique selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il s'agit du promoteur du gène de la toxine bêta 2 de *Clostridium perfringens* ou d'un
- 15 fragment de celui-ci.
4. Cassette d'expression d'un transgène caractérisée en ce qu'elle comprend, dans l'orientation 5' -> 3' :
- 20 - un acide nucléique selon la revendication 1, et,
- ledit transgène.
5. Cassette d'expression selon la revendication 4 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, en 3' du transgène, un terminateur transcriptionnel.
- 25 6. Cassette d'expression selon la revendication 4 ou 5 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, entre l'acide nucléique et le transgène, un signal de sécrétion.
7. Cassette d'expression selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisée en
- 30 ce que le transgène code pour une toxine ou un fragment ou variant de toxine.

8. Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que le transgène code pour une toxine ou un fragment ou variant de toxine d'une bactérie pathogène.
- 5 9. Vecteur comprenant un acide nucléique selon la revendication 1 ou une cassette d'expression selon la revendication 4.
10. Vecteur selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il est fonctionnel dans les bactéries.
- 10 11. Vecteur selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il est fonctionnel dans les bactéries du genre *Clostridium*, notamment dans les bactéries *Clostridium perfringens*.
- 15 12. Cellule recombinante comprenant un acide nucléique selon la revendication 1 ou une cassette d'expression selon la revendication 4 ou un vecteur selon la revendication 9.
- 20 13. Cellule selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule procaryote, de préférence une bactérie.
- 25 14. Procédé de production d'un polypeptide comprenant l'introduction dans une cellule hôte d'un transgène codant pour ledit polypeptide sous contrôle d'un promoteur tel que défini dans la revendication 1, puis la récupération dudit polypeptide.
- 30 15. Procédé de production d'un polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend la culture d'une cellule recombinante selon la revendication 12 comprenant une cassette d'expression selon la revendication 4 ou un vecteur selon la revendication 9, le transgène codant pour ledit polypeptide.
16. Procédé selon la revendication 14 ou 15 caractérisé en ce que la cellule est une bactérie du genre *Clostridium*.

17. Procédé selon l'une des revendications 14 à 16 pour la production d'une toxine ou d'un toxoïde.

5 18. Utilisation d'un acide nucléique selon la revendication 1 pour la production de polypeptides.

19. Acide nucléique comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 3.

10 20. Procédé de préparation d'une composition immunogène comprenant les étapes suivantes :

a) l'expression d'une ou plusieurs toxines (ou toxoïdes correspondants) dans une cellule selon la revendication 12,

b) la récolte du surnageant,

15 c) de manière facultative, le traitement du surnageant pour purifier ou concentrer la (les) toxine(s) ou toxoïde(s),

d) l'inactivation de la (des) toxine(s), et,

e) de manière facultative, le conditionnement de la (des) toxine(s) inactivée(s) ou du (des) toxoïde(s).

20

21. Composition immunogène comprenant un toxoïde d'une toxine produite selon le procédé de la revendication 17.

25 22. Composition immunogène comprenant un toxoïde de la toxine Béta2 recombinante.

23. Toxine Béta2 recombinante essentiellement purifiée.

21 SEP. 1998

Séquence SEQ ID n° 1

```

1   ATTTGGGATATCTTAAATTTAGCACAGAAGAATGTTTAAATGAAATAAAGATAATAAAAA
    -----> P385
61  GATATATTAATTATATAGCTGAAAATTTATAATTATATGATAAGTATAGTTAATAAATAA
121 AAAGTGTTCCTCGGGGGACACTTTTTTGTGTTTAAAAAGGAAAATATAAATAAAATTTAGAT
181 AAAAGTGTAATAAATAATTATTTTATTTTAAATTTGTTAAAAATTTGATATAATTGAATTG
241 TAAAAAAAATTTTCAGGGGGGAATATAAATGAAAAAATTATTTCAAAGTTTACTGTAATT
    M K K I I S K F T V I
301 TTTATGTTTTTCATGTTTTCTTATTGTTGGAGCAATAAGTCCAATGAAAGCAAGTGCNAAA
    F M F S C F L I V G A I S P M K A S A K
12  F M F S C F L I V G A I S P M K A S A K
361 GAAATCGACGCTTATAGAAAGGTAATGGAGAATTATCTTAATGCTTTAAAAAACTACGAT
    E I D A Y R K V M E N Y L N A L K N Y D
32  E I D A Y R K V M E N Y L N A L K N Y D
421 ATTAATACAGTTGTAAACATTTTACAAGATGAAAGAGTAAATAATGTTGAACAGTATAGA
    I N T V V N I S E D E R V N N V E Q Y R
52  I N T V V N I S E D E R V N N V E Q Y R
481 GAAATGTTAGAAGATTTTAAATATGATCCTAACCAACAACCTGAAATCTTTTGAAATACCT
    E M L E D F K Y D P N Q Q L K S F E I L
72  E M L E D F K Y D P N Q Q L K S F E I L
541 AATTCACAAAAGAGCGATAATAAAGAAATATTTAATGTAAAAACTGAATTTTTTAAATGGT0
    N S Q K S D N K E I F N V K T E F L N G
92  N S Q K S D N K E I F N V K T E F L N G
601 GCAATTTATGATATGGAATTTACTGTATCATCTAAAGATGGAATAATAGTATCTGAT
    A I Y D M E F T V S S K D G K L I V S D
112 A I Y D M E F T V S S K D G K L I V S D
661 ATGGAAAGAACAAAAGTTGAGAATGAAGGAAAATATATTTTAAACACCATCATTTAGAAT
    M E R T K V E N E G K Y I L T P S F R T
132 M E R T K V E N E G K Y I L T P S F R T
721 CAAGTTTGTACATGGGATGATGAAGTACACAAGCAATTGGGGGAGTTTATCCACAAACA
    Q V C T W D D E L A Q A I G G V Y P Q T
152 Q V C T W D D E L A Q A I G G V Y P Q T
781 TATTCTGATAGATTTACATATTATGCAGATAATATATTATTAACTTCAGACAATATGCA
    Y S D R F T Y Y A D N I L L N F R Q Y A
172 Y S D R F T Y Y A D N I L L N F R Q Y A
841 ACTTCAGGTTCAAGAGATTTTAAAGTAGAATATAGTGTGTTAGATCATTGGATGTGGAAA
    T S G S R D L K V E Y S V V D H W M W K
192 T S G S R D L K V E Y S V V D H W M W K
901 GATGATGTTAAAGCTTCTCAAATGGTATATGGTCAAATCCTGATTCTGCTAGACAAATA
    D D V K A S Q M V Y G Q N P D S A R Q I
212 D D V K A S Q M V Y G Q N P D S A R Q I
961 AGATTATATATAGAAAAAGGACAATCTTTCTATAAATATAGAATAAGAATTAAAAACTTT
    R L Y I E K G Q S F Y K Y R I R I K N F
232 R L Y I E K G Q S F Y K Y R I R I K N F
1021 ACACCTGCATCAATTAGAGTATTTGGTGAAGGGTATTGTGCATAGAAAAAATATGAAGT
    T P A S I R V F G E G Y C A * <-----
252 T P A S I R V F G E G Y C A * <-----
1081 GACTTAGTCACTTCATATTTTTTTTTTACTATTAATTTTATTATATAAAAACCTAACATACA
    ----->
1141 TGAAAGTATTTCTTAATACAGTTATATCAAAATTAAGTAGGGGAAATAAAATAAAAGGCT
1201 AAAAAGTATATTAATAAACTATAAAATTTATTAATTAGGTTTAAAGGTGTTATATTTATT
1261 TATGATTATAGGAATAAATATGCCAAATGGAATAAATAAAAGTAATATTAATAATTGGTC
1321 TAAAAAGTATACATCATTGATAAAAGAAAAATTACCAGTAAAAATTGAGCTTAAAAAATT
    P393 <-----
1381 AAATGTAAATTT 1392

```

Séquence SEQ ID n° 2

1 ATTTGGGATATCTTAAATTTAGCACAGAAGAATGTTTAAATGAAATAAAGATAATAAAAA
-----> P385
61 GATATATTAATTATATAGCTGAAAATTTATAATTATATGATAAGTATAGTTAATAAATAA
121 AAAGTGTTCTCGGGGGACACTTTTTTGTGTTTAAAAAGGAAAATATAAATAAAATTTAGAT
181 AAAAGTGTAATAATAATTATTTTTATTTTAAATTTGTTAAAAATTTGATATAATTGAATTG
241 TAAAAAAATTTTCAGGGGGGAATATAAATGAAAAAAATTATTTCAAAGTTTACTGTAATT
1
301 TTTATGTTTTTCATGTTTTCTTATTGTT

Séquence SEQ ID n° 3

10

M K K I I S K F T V I
GGAGCAATAAGTCCAATGAAAGCAAGTGCAAAA
F M F S C F L I V G A I S P M K A S A
GAAATCGACGCTTATAGAAAGGTAATGGAGAATTATCTTAATGCTTTAAAAAACTAC

15

Séquence SEQ ID n° 4

P318 : 5'-GAAATGTTTACAACGTGATTAATATCGTAG-3'

20

Séquence SEQ ID n° 5

P292 : 5'-TCAAGTTTGTACATGGGATGATG-3'

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

S.N. 091531.438

OBLON, SPIVAK, MCCLELLAND, MAIER & NEUSTADT, P.C.

ATTORNEYS AT LAW

FOURTH FLOOR

1755 JEFFERSON DAVIS HIGHWAY

ARLINGTON, VIRGINIA 22202 U.S.A.

Filed March 20. 00